

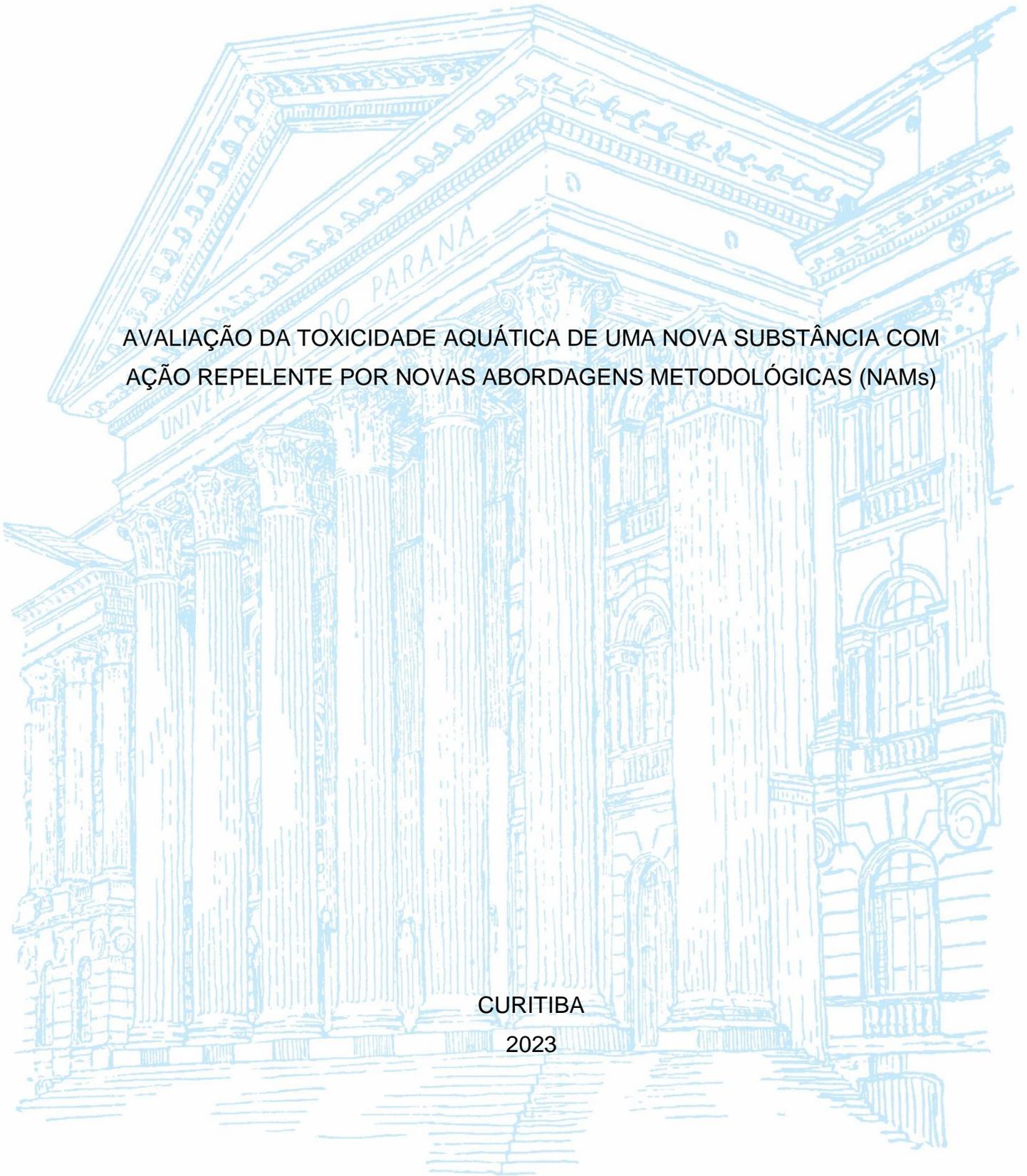
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

HELENA LOURENÇO ZIELONKA

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AQUÁTICA DE UMA NOVA SUBSTÂNCIA COM  
AÇÃO REPELENTE POR NOVAS ABORDAGENS METODOLÓGICAS (NAMs)

CURITIBA

2023



HELENA LOURENÇO ZIELONKA

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AQUÁTICA DE UMA NOVA SUBSTÂNCIA COM  
AÇÃO REPELENTE POR NOVAS ABORDAGENS METODOLÓGICAS (NAMs)

TCC apresentada ao curso de Pós-Graduação em  
Genética, Setor de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal do Paraná, como requisito  
parcial à obtenção do título de Bacharel em  
Biomedicina

Orientadora: Prof. Dra. Daniela Morais Leme

CURITIBA

2023

## TERMO DE APROVAÇÃO

HELENA LOURENÇO ZIELONKA

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AQUÁTICA DE UMA NOVA SUBSTÂNCIA COM  
AÇÃO REPELENTE POR NOVAS ABORDAGENS METODOLÓGICAS (NAMS)

TCC apresentado ao curso de Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de  
Bacharel em Biomedicina.



Prof. Dra. Daniela Morais Leme  
Departamento Genética - UFPR  
UFPR nº 204565

---

Prof Dra. Daniela Morais Leme

Orientadora – Departamento de Genética da Universidade Federal do  
Paraná



---

Dra. Irisdoris Rodrigues de Souza

Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná



**Prof. Dr. Matheus M. Roberto**

---

Docente - FHO/UNIARARAS

Prof. Dr. Matheus Mantuanelli Roberto

Centro Universitário Hermínio Ometto (UNIARARAS)

Curitiba, 05 de dezembro de 2023.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Luciana e Felipe, pelo apoio e amor incondicional em todos os momentos da minha vida. Mãe, toda minha admiração não cabe em palavras, um dia espero retribuir tudo o que fez por mim. Pai, obrigada pelo suporte mesmo de longe. Tenho muito respeito a sua coragem e determinação.

Aos meus irmãos, Hugo, Maria Clara, Luiza, Arthur e Noah por serem minha maior motivação. Tudo o que eu faço é sempre por vocês e para vocês. Vocês são os melhores companheiros de vida que eu poderia ter.

À toda minha família, tios, primos, avós, madrasta e padrasto, que se mostraram sempre presentes com todo carinho e amparo que eu poderia precisar. Obrigada por acreditarem nos meus sonhos, eu não estaria aqui se não fossem vocês.

Aos meus amigos, Amanda, Cesar, Júlia, Larissa, Mylena, Pietra, Rafaela e Vanessa por todas as risadas e choros compartilhados ao longo da graduação. Esse grupo foi o maior presente que o curso de Biomedicina poderia me dar e serei eternamente grata por estarem ao meu lado. Vou levar para sempre no meu coração os nossos momentos juntos.

À Camilla, por acreditar em mim mesmo quando eu não acreditava. Suas palavras e seus abraços foram meu maior conforto nos momentos de frustração. Cada conquista minha tem você.

Aos membros do Laboratório de (Eco)Toxicologia *in vitro* e do Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental, por todo conhecimento compartilhado nesses últimos anos. Sempre dispostos a me explicar e me ajudar, eu não poderia ter realizado esse trabalho sem a ajuda de cada um de vocês.

À Ketelen, pelo auxílio e companhia durante os experimentos. Foi uma honra compartilhar tantos momentos dentro do laboratório com uma cientista e pessoa que admiro muito.

Ao Rafael, pela contribuição com o teste de microalgas. Sua ajuda complementou muito meu trabalho.

À Prof.<sup>a</sup> Cynthia, que em tão pouco tempo me ensinou tanta coisa. Obrigada por sua disponibilidade e paciência.

À minha orientadora, Prof. Dra. Daniela, pela oportunidade e confiança depositada em mim. Sempre serei grata pelos ensinamentos e pelo tempo que pude aprender com uma profissional tão notável.

## RESUMO

Ingredientes cosméticos podem atingir recursos hídricos dependendo da forma de uso de certos tipos de produtos cosméticos (e.g., protetores solares, desodorantes, xampus e repelentes de insetos) ou por meio de tratamentos de esgoto ineficientes. Contudo, dados recentes acerca da toxicidade aquática de ingredientes cosméticos, em geral, são escassos ainda. O trabalho teve como objetivo analisar os possíveis efeitos de toxicidade aquática e biodegradação de uma substância recentemente desenvolvida com propriedade repelente contra insetos, utilizando Novas Abordagens Metodológicas (NAMs). A toxicidade aquática foi analisada por meio de ensaios *in vitro* com linhagem celular de truta arco-íris (OECD TG 249) e microalgas clorófitas *Desmodesmus subspicatus* (OECD TG 201). Em ambos os ensaios, 6 concentrações diferentes do repelente foram testadas (31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000 mg/L) e valores de viabilidade celular e inibição de crescimento utilizados para cálculo de concentração efetiva média (EC<sub>50</sub>). Ademais, as plataformas VEGA, QSAR Toolbox e Toxtree forneceram previsões acerca da classificação de perigo tóxico, bioacumulação, biodegradabilidade e toxicidade aguda para peixes e algas. Na avaliação com a microalga clorófita *Desmodesmus subspicatus*, após 72 horas de exposição, o valor de EC<sub>50</sub> calculado a partir da taxa inibição de crescimento foi de 45,56 mg/L. No ensaio de citotoxicidade com células RTgill-W1, os valores de EC<sub>50</sub> para os três marcadores com a substância repelente foram acima de 100 mg/L. Vermelho Neutro (integridade da membrana lisossomal): > 1000 mg/L; CFDA-AM (integridade da membrana celular): 884,6 mg/L; *alamarBlue*<sup>™</sup> (atividade metabólica): 472,5 mg/L. Em contrapartida, os modelos *in silico* mostraram que o repelente não tem potencial bioacumulativo, possui alta biodegradabilidade e toxicidade moderada para peixes e algas. O valor mais restritivo do ensaio com algas indica maior sensibilidade das microalgas à exposição ao repelente quando comparado a peixes. São necessários mais estudos para investigação quanto à toxicidade aguda para peixes da nova substância repelente, devido a diferença de resultados dos ensaios de linhagens celulares e modelos *in silico*. Este estudo concentra-se na avaliação de apenas dois níveis tróficos (algas e peixes) do ambiente aquático, destacando a necessidade de pesquisas adicionais sobre os impactos nos microcrustáceos. Torna-se evidente a importância de conduzir avaliações de perigo que representem uma variedade de níveis tróficos e ecossistemas, a fim de obter uma avaliação mais abrangente e precisa da segurança ambiental de novas substâncias.

Palavras-chave: toxicidade aquática; bioacumulação; *in vivo*; *in silico*.

## ABSTRACT

Cosmetic ingredients can reach water resources depending on the usage of certain types of cosmetic products (e.g., sunscreens and skin repellents) or through inefficient sewage treatments. However, data on the aquatic toxicity of cosmetic ingredients are still scarce. This study aimed to analyze the potential effects of aquatic toxicity and biodegradation of a recently developed substance with insect-repellent properties using New Approach Methodologies (NAMs). Aquatic toxicity was assessed through in vitro assays with a rainbow trout cell line (OECD TG 249) and chlorophyte microalgae *Desmodesmus subspicatus* (OECD TG 201). In both assays, six different concentrations of the repellent were tested (31.25; 62.5; 125; 250; 500; 1000 mg/L), and values of cell viability and growth inhibition were used to calculate the median effective concentration (EC<sub>50</sub>). Additionally, the VEGA, QSAR Toolbox, and Toxtree platforms provided predictions regarding toxic hazard classification, bioaccumulation, biodegradability, and acute toxicity for fish and algae. In the evaluation with the microalgae *D. subspicatus*, after 72 hours of exposure, the calculated EC<sub>50</sub> value based on growth inhibition was 45.56 mg/L. In the cytotoxicity assay with RTgill-W1 cells, the EC<sub>50</sub> values of the repellent substance were above 100 mg/L for the three markers. Neutral Red (lysosomal membrane integrity): > 1000 mg/L; CFDA-AM (cellular membrane integrity): 884.6 mg/L; *alamarBlue*<sup>™</sup> (metabolic activity): 472.5 mg/L. On the other hand, in silico models showed that the repellent does not have bioaccumulative potential, has high biodegradability, and exhibits moderate toxicity to fish and algae. The most restrictive value from the algae assay indicates higher sensitivity of microalgae to the repellent compared to fish. Further studies are necessary to investigate the acute toxicity of the new repellent substance for fish, due to the difference in results between cell line assays and in silico models. This study focuses on evaluating only two trophic levels (algae and fish) in the aquatic environment, highlighting the need for additional research on the impacts on microcrustaceans. The importance of conducting hazard assessments representing a variety of trophic levels and ecosystems becomes evident for a more comprehensive and accurate assessment of the environmental safety of new substances.

Keywords: aquatic toxicity; bioaccumulation; *in vivo*; *in silico*.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCF	- Bioconcentration Factor
CFDA-AM	- 5-Carboxyfluorescein Diacetate, Acetoxymethyl Ester
DEET	- N,N-dietil-meta-toluamida
DMSO	- Dimetilsulfóxido
EC50	- Half-maximal Effective Concentration
ECHA	- European Chemicals Agency
EPA	- United States Environmental Protection Agency
IR3535	- Butilacetilaminopropionato de Etila
LC50	- Half-maximal Lethal Concentration
LOEC	- Lowest Observed Effects Concentration
NOEC	- No Observed Effect Concentration
OECD	- Organization for Economic Co-operation and Development
PBS	- Phosphate-buffered Saline

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>8</b>
1.1 OBJETIVOS .....	9
1.1.1 Objetivo geral .....	9
1.1.2 Objetivos específicos.....	9
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>9</b>
2.1 DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS REPELENTE ECO-FRIENDLY .....	9
2.2 AVALIAÇÃO DE SEGURANÇA AMBIENTAL DE PRODUTOS COSMÉTICOS .	11
2.3 NOVOS MÉTODOS DE ABORDAGEM (NAMS) NA AVALIAÇÃO DE RISCO ECOLÓGICO.....	12
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>16</b>
3.1 NOVA SUBSTÂNCIA REPELENTE .....	16
3.2 PREDIÇÕES <i>IN SILICO</i> .....	16
3.3 TESTE DA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>DESMODESMUS</i> <i>SUBSPICATUS</i> .....	17
3.4 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA PARA PEIXES COM CÉLULAS RTGILL-W1 18	
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>20</b>
4.1 PREDIÇÕES <i>IN SILICO</i> .....	20
4.2 TESTE DA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>DESMODESMUS</i> <i>SUBSPICATUS</i> .....	22
4.3 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA PARA PEIXES COM CÉLULAS RTGILL-W1 22	
4.4 COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS .....	24
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	<b>25</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>26</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Doenças transmitidas por vetores representam uma das maiores ameaças à saúde global, expondo cerca de 80% da população a enfermidades como dengue, Chikungunya, malária e zika (WHO, 2020). No Brasil, houve um aumento expressivos, com 11,6 milhões de casos e 7.043 óbitos entre 2008 e 2019 causados por essas doenças, afetando especialmente populações mais vulneráveis (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

O controle dessas doenças exige diversas abordagens, incluindo o monitoramento dos vetores para prevenir surtos epidêmicos (DA SILVA; RICCI-JÚNIOR, 2020; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022; WHO, 2020). Os repelentes desempenham um papel vital na prevenção, afastando e reduzindo o contato com os vetores (GAO et al., 2020; ZARA et al., 2016). Tanto os repelentes sintéticos, como DEET, IR3535 e Icaridina, quanto os derivados de plantas, como óleo de eucalipto limão, citronela e andiroba, são amplamente utilizados para este fim (PAUMGARTTEN; DELGADO, 2016).

A eficácia desses produtos em prevenir picadas de insetos, somada com o aumento da conscientização sobre os riscos associados a essas doenças, impulsionaram o mercado e a produção dos repelentes (DENG et al., 2023; POHLIT et al., 2011). Essas substâncias podem ser liberadas continuamente no ambiente aquático, pelo descarte e tratamento inadequado de esgoto, e persistir por longos períodos, afetando os organismos desse ecossistema (WANG et al., 2021).

Estudos realizados em todo o mundo identificaram a presença de substâncias repelentes em águas superficiais, águas subterrâneas e sedimentos (LOOS et al., 2013; MA et al., 2018; QUEDNOW; PÜTTMANN, 2009; SUI et al., 2009). A informação sobre toxicidade aquática desses produtos, no entanto, é limitada, visto que os repelentes mais utilizados no mundo não foram submetidos à uma avaliação de risco ecológicas quando foram registrados para uso comercial (COSTANZO et al., 2007).

A investigação da toxicidade ambiental de produtos de cuidado pessoal faz-se imprescindível diante da demanda no desenvolvimento de produtos *eco-friendly*. A partir de dados obtidos em testes ecotoxicológicos é possível identificar se as novas formulações podem ser consideradas mais seguras, eficazes, ambientalmente amigáveis, biodegradáveis e acessíveis (DA SILVA; RICCI-JÚNIOR, 2020).

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

O estudo teve como objetivo investigar os potenciais efeitos de ecotoxicidade de uma nova substância com ação repelente contra insetos por meio de Novas Abordagens Metodológicas (NAMs).

### 1.1.2 Objetivos específicos

- a. Fornecer informações de toxicidade aguda, bioacumulação e biodegradação por predições *in silico*;
- b. Avaliar a toxicidade aguda para peixes por meio do ensaio *in vitro* com células RTgill-W1 (OECD *Test Guideline* 249);
- c. Analisar o efeito na inibição do crescimento da microalga *Desmodesmus subspicatus* (OECD *Test Guideline* 201).
- d. Realizar a análise integrada dos dados para definição de perigo a ambientes aquáticos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS REPELENTES ECO-FRIENDLY

Produtos de Cuidados Pessoais (PCPs) são considerados contaminantes orgânicos emergentes pela EPA devido à lacuna sobre regulamentação de uso, além da falta de informações sobre o impacto na saúde humana e ambiental (BRAUSCH; RAND, 2011; MORIN-CRINI et al., 2021; EPA 2008). Alguns exemplos de PCPs incluem filtros proteção solar, antimicrobianos, conservantes, fragrâncias e repelentes de insetos (PEDROUZO et al., 2011). Embora esses compostos não sejam normalmente incluídos em monitoramentos ambientais de rotina, sua crescente utilização e o potencial risco para ecossistemas os tornam foco de preocupação ambiental (CAMPOS et al., 2023; SUN et al., 2016). Nos últimos anos, foram encontrados compostos de PCPs em uma variedade de organismos aquáticos, como

peixes e invertebrados (JYOTI; SINHA, 2023; LUO et al., 2017; MACEDO; TORRES; SANTOS, 2017).

Assim como os outros PCPs, o desenvolvimento de formulações de repelentes mais sustentáveis, têm sido foco para muitos pesquisadores e intuições de pesquisa nos últimos anos (LUCAS-BARBOSA et al., 2022; PARDINI et al., 2021; SHARMA et al., 2018). Lupi et al. (2013) afirmam que um repelente ideal, além da eficácia em afastar insetos, deve ter impacto mínimo no meio ambiente. Os repelentes de insetos podem chegar aos corpos d'água após serem lavados da pele e de roupas em atividades recreativas e, principalmente, pela remoção ineficiente durante o tratamento de esgoto (BRAUSCH; RAND, 2011).

As principais formulações repelentes disponíveis no mercado brasileiro contêm componentes químicos sintéticos como DEET, icaridina e IR3535 em sua formulação (STEFANI et al., 2009). O DEET é utilizado como repelente há mais de 50 anos e por cerca de 200 milhões de pessoas em todo mundo (DEGENNARO, 2015). Apesar de existir um número limitado de estudos de toxicidade aquática aguda para o DEET, a substância é considerada moderadamente tóxica para peixes e invertebrados de água doce (Tabela 1). Ademais, o DEET possui baixa capacidade de bioacumulação e é facilmente biodegradável (ARONSON et al., 2012; WEEKS; GUINEY; NIKIFOROVZ, 2012). Um estudo ecológico realizado na China, identificou que a ordem de sensibilidade ao DEET foi a seguinte: algas > crustáceos > anfíbios > peixes > vermes > insetos > anelídeos (GAO et al., 2020).

TABELA 1 – DADOS DE TOXICIDADE AQUÁTICA PRESENTE BASE DE DADOS DE ECOTOXICOLOGIA

Repelente	Organismo	LC <sub>50</sub> / EC <sub>50</sub> (mg/L)
DEET <sup>1</sup>	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (truta arco-íris)	75
	<i>Levanderina fissa</i> (alga)	72,9
Icaridina <sup>1</sup>	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (truta arco-íris)	173
	<i>Scenedesmus subspicatus</i> (alga)	87,3
IR3535 <sup>2</sup>	<i>Danio rerio</i> (paulistinha)	>100
	<i>Desmodesmus subspicatus</i> (alga)	> 100

Fonte: <sup>1</sup> U.S. EPA 2023; <sup>2</sup> ECHA 2023.

A icaridina surgiu no final da década de 80 como um ingrediente ativo alternativo ao DEET (DEBBOUN et al., 2014), sendo considerada uma opção mais

segura por causar menos irritação dérmica (ROY et al., 2017). No entanto, em um estudo de Almeida e colaboradores (2018), a exposição à icaridina levou a alta taxa de mortalidade em larvas de salamandra (predadores naturais de larvas de mosquitos), o que pode desencadear no aumento da população de mosquitos.

Apesar de não ser considerado tóxico para o ambiente aquático (ECHA, 2014), o IR3535 se mostrou menos eficaz que o DEET para repelir mosquitos do gênero *Anopheles*, vetores da malária (GOODYER et al., 2010).

Nos últimos anos, o interesse em desenvolver formulações repelentes mais naturais aumentou, por serem considerados mais seguros, biodegradáveis, econômicos e amplamente disponíveis (DA SILVA; RICCI-JÚNIOR, 2020). Os óleos essenciais são misturas complexas de hidrocarbonetos voláteis e apresentam uma alternativa de grande relevância aos repelentes sintéticos, por exemplo (NERIO; OLIVERO-VERBEL; STASHENKO, 2010; TISGRATOG et al., 2016). Os óleos essenciais de eucalipto-limão (*Corymbia citriodora*), citronela (*Cymbopogon sp.*) e andiroba (*Carapa guianensis*) são os mais utilizados para repelir insetos (TAVARES et al., 2018). No estudo de Pino-Otín et al. (2021), foi observado que a exposição de *Daphnia magna* ao citronelol (composto encontrado no óleo de citronela) resultou em um valor de LC50 igual a 14,11 mg/L, indicando um efeito tóxico sobre o organismo invertebrado aquático.

Apesar de possuir baixa toxicidade e ter eficácia comprovada por estudos, a alta volatilidade dos óleos essenciais confere proteção curta e variável contra insetos (KATZ; MILLER; HEBERT, 2008; STEFANI et al., 2009; TRONGTOKIT et al., 2005). Diante disso, o processo de encapsulamento das substâncias ativas por meio da nanotecnologia possibilitou a diminuição das taxas de evaporação e aumento da biodisponibilidade e estabilidade química (MAIA; MOORE, 2011; SAKULKU et al., 2009).

## 2.2 AVALIAÇÃO DE SEGURANÇA AMBIENTAL DE PRODUTOS COSMÉTICOS

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) prevê que a avaliação de segurança deve preceder a oferta de produtos cosméticos ao mercado, com objetivo identificar e explicar sob quais condições de fabricação e uso o produto pode ser considerado seguro. É necessário realizar avaliações de risco, devendo considerar

parâmetros toxicológicos dos ingredientes para fornecer bases técnicas adequadas para formulação de produtos seguros (NAGY et al., 2020; NOHYNEK et al., 2010)

Na identificação do perigo é feita a coleta de dados para determinar se a substância é tóxica e em quais circunstâncias, avaliando seus efeitos potenciais na saúde humana e no meio ambiente. Com esses dados é possível determinar os limites de exposição considerados seguros, ou seja, níveis de concentração sem efeito tóxico (STAHLMANN; HORVATH, 2015)

Existe uma lacuna evidente na regulamentação brasileira acerca da segurança ambiental de PCPs (HIGUCHI et al., 2012). Organizações e agências dos EUA e da União Europeia, (EPA e ECHA, respectivamente) já possuem diretrizes e normas estabelecidas, concedendo certificações para produtos cosméticos que estejam em conformidade com os conceitos estabelecidos.

A avaliação de toxicidade aquática faz parte do desenvolvimento de produtos ambientalmente mais seguros e se caracteriza por investigar a capacidade de substâncias químicas ou produtos causarem efeitos adversos em organismos aquáticos (HALDER et al., 2014). A obtenção de dados a partir de avaliações de risco e perigo ambiental são determinados por organismos que representam os três níveis tróficos: algas ou plantas, invertebrados e vertebrados (DE ALBUQUERQUE VITA et al., 2023).

Organizações ambientais requerem um conjunto de indicadores para a avaliação da toxicidade em ambientes aquáticos: toxicidade aguda, toxicidade crônica, bioacumulação e biodegradação (SCHOLZ et al., 2013). Os testes de toxicidade aguda avaliam efeitos após uma única exposição de uma substância e expressam valores de Concentração de Efeito a 50% dos organismos ( $EC_{50}$ ) (LECHUGA et al., 2016). Já nos testes de toxicidade crônica, os organismos são expostos a concentrações da substância ao longo de um período prolongado e podem identificar valores de NOEC e/ ou LOEC (EPA, 2002).

### 2.3 NOVOS MÉTODOS DE ABORDAGEM (NAMS) NA AVALIAÇÃO DE RISCO ECOLÓGICO

À medida que a demanda por produtos e tecnologias mais seguras cresce, o campo de desenvolvimento e validação de métodos alternativos para avaliação toxicológica está se tornando cada vez mais importante. O termo Toxicologia Verde

(*Green Toxicology*) se refere à aplicação de testes toxicológicos no desenvolvimento de produtos, principalmente em estágio iniciais, para a obtenção de informações que possam contribuir para a produção com menos desperdício de produtos de menor toxicidade (MAERTENS; HARTUNG, 2018). Nesse sentido, quando comparados a NAMs, testes com animais exigem um maior tempo de execução e por conta disso, muitas vezes menos vantajosos na avaliação de ingredientes ativos candidatos para uma formulação (SULLIVAN et al., 2011).

As NAMs compreendem um conjunto de abordagens de testes não baseados em animais, que abrangem métodos *in silico* e *in vitro* utilizados em testes de segurança e avaliação de riscos, principalmente da área de toxicologia e segurança de produtos químicos (CATTANEO et al., 2023; WESTMORELAND et al., 2022). Essas metodologias buscam reduzir ou substituir o uso de animais em testes laboratoriais, seguindo o princípio dos 3R's de Russel e Burch (1959) *replacement*, *reduction* e *refinement* (substituição, redução e refinamento).

Para a validação de novas substâncias, existe a necessidade da utilização e desenvolvimento de testes de alta performance tanto na identificação de ingrediente de menor toxicidade quanto na produção de produtos que geram menor impacto na saúde humana e no meio ambiente (KREBS; MCKEAGUE, 2020). A combinação de ferramentas *in silico* e *in vitro* contribui para compreensão crescente das vias e mecanismos dos efeitos toxicológicos, o que aumentará a precisão das previsões de toxicidade e ajudará a traduzir dados *in vitro* em informações relevantes de perigo *in vivo* (BURDEN et al., 2015).

O emprego de abordagens *in silico* consiste na predição dos valores de ecotoxicidade com base em propriedade químicas e características dos organismos-teste (RAUNIO, 2011; SARIGIANNIS; STRATIDAKIS; KARAKITSIOS, 2023). Os modelos quantitativos de relação estrutura-atividade (QSARs), por exemplo, estabelecem uma correlação entre estrutura molecular de uma substância à sua atividade biológica ou toxicológica por meio de modelos matemáticos (MAZZATORTA et al., 2004), mesmo sem dados experimentais (CASSANI; GRAMATICA, 2015).

A OECD oferece um software gratuito (QSAR Toolbox) para ajudar na avaliação de substâncias químicas quanto a sua segurança, fornecendo uma variedade de informações sobre propriedades toxicológicas, ecotoxicológicas e físico-químicas (SCHULTZ et al., 2018). Outra ferramenta *in silico* muito utilizada é a plataforma VEGA, a qual possui diferentes tipos de modelos de predição que

fornece um domínio de aplicabilidade, que pode ser definido como a confiabilidade da predição do modelo (BLÁZQUEZ et al., 2020).

As plantas aquáticas (incluindo microalgas, macroalgas etc.) possuem um papel fundamental nos ecossistemas aquáticos, sendo a base da cadeia alimentar aquática (CESCHIN; BELLINI; SCALICI, 2021). Logo, têm uma grande importância na introdução de substâncias tóxicas nesses ambientes, podendo ser utilizadas como biomarcadores para detectar presença, concentração e efeitos de contaminantes (COSTA et al., 2018).

Microalgas são amplamente utilizadas em estudos ecotoxicológicos devido à sua grande sensibilidade e facilidade de cultivo em laboratório (PAIXÃO et al., 2008). Esses testes são adequados para análises em larga escala e miniaturizadas, permitindo a análise da toxicidade de uma ampla gama de produtos químicos e amostras de água a custos reduzidos e com pequenos volumes de amostra (CESCHIN; BELLINI; SCALICI, 2021). O teste de inibição de crescimento de algas padronizado pela OECD (OECD TG 201) consiste em expor microalgas a diferentes concentrações de uma substância teste por um período de 72 horas e avaliar o efeito no crescimento das plantas de alga doce quando comparadas ao grupo controle. O crescimento e a inibição do crescimento são avaliados por meio de medições da biomassa das algas em função do tempo. Seu ciclo reprodutivo curto, sensibilidade a diversas substâncias e cultivo simples, tornam a microalga *Desmodesmus subspicatus* uma espécie adequada para a investigação e impactos ecológicos dos contaminantes aos ecossistemas aquáticos (VENDRELL et al., 2009).

Peixes são especialmente importantes para a identificação dos efeitos de novas formulações, já que representam o grupo mais diversos de vertebrados (BOLS et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2018) além de serem modelos que, em alguns casos, possam dar suporte a estimativa de efeitos à saúde humana (extrapolação entre espécies) (ZELIKOFF, 1998). Ademais, sua capacidade de bioacumulação, por serem consumidores primários e secundários, faz com que sejam organismos muito utilizados em estudos de toxicidade aquática (NORRGREN, 2012).

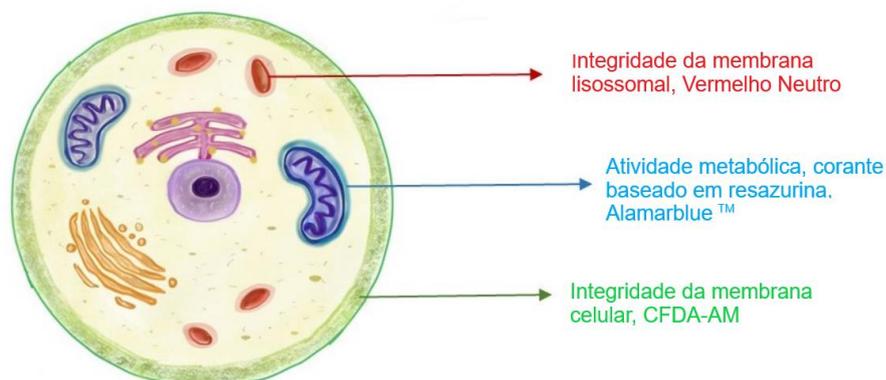
Por conta da sua relevância, os estudos de toxicidade aguda em peixes são atualmente os testes de Ecotoxicologia em vertebrados mais frequentemente realizados (BURDEN; SEWELL; CHAPMAN, 2015) e um dos poucos testes padronizados onde a morte é o *endpoint* analisado (BURDEN et al., 2020). Logo, métodos baseados em linhagens permanentes de células de peixe têm sido propostos

como alternativo aos testes *in vivo*, já que requerem um número substancial de organismos e produzem grande quantidade de resíduos (TANNEBERGER et al., 2013). Métodos *in vitro* consomem menos recursos em termos de tempo, manutenção de infraestrutura e gerenciamento de resíduos, todas essas características com triagem de alto rendimento (DE ARAÚJO et al., 2014).

Uma alternativa *in vitro* foi recentemente proposta usando a viabilidade celular em uma linhagem de células epiteliais de brânquia de truta arco-íris (RTgill-W1) como meio de prever a toxicidade aguda (NATSCH et al., 2018). O método de teste OECD 249 quantifica a viabilidade usando marcadores fluorescentes para atividade metabólica, integridade da membrana celular e lisossomal. Combinado com sua capacidade preditiva de toxicidade aguda em peixes, ensaios de linhagem celular RTgill-W1 constituem um método experimental alternativo eficaz aos testes convencionais de toxicidade em peixes (FISCHER et al., 2019).

A viabilidade celular é avaliada com base em três corantes fluorescentes: *alamarBlue*<sup>TM</sup> (mede a atividade metabólica), CFDA-AM (avalia a integridade da membrana celular) e Vermelho-Neutro (avalia a integridade da membrana lisossomal) (Figura 1). A *alamarBlue*<sup>TM</sup> entra nas células em sua forma não fluorescente e é convertida no produto fluorescente (resorufina) por oxidoredutases mitocondriais, microsossomais ou citoplasmáticas. A redução da fluorescência da resorufina indica declínio na atividade metabólica celular, incluindo a ruptura das membranas mitocondriais. CFDA-AM é um substrato de esterase que pode servir como um marcador de atividade enzimática (necessária para ativar sua fluorescência) e de integridade da membrana celular (necessária para retenção intracelular de seu produto fluorescente), que é convertido em 5-carboxifluoresceína em células intactas onde é retido. O vermelho neutro se difunde nas células e se acumula nos lisossomos. A ruptura dos lisossomos resulta na liberação de vermelho neutro para o citoplasma e conseqüentemente na diminuição da leitura de fluorescência.

FIGURA 1 - TRÊS CORANTES INDICADORES FLUORESCENTES SERVEM PARA DETERMINAR A VIABILIDADE CELULAR COM BASE EM DIFERENTES ALVOS (OECD TG 249).



FONTE: OECD Test Guideline 249.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 NOVA SUBSTÂNCIA REPELENTE

A nova substância com atividade repelente que está em desenvolvimento pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Francisco de Assis Marques, do Departamento de Química da UFPR é derivada de um atraente de mosquitos produzido pelo ser humano, bem como por outros animais. É o primeiro repelente de mosquitos obtido a partir de transformações nos grupos funcionais desse atraente e está sob processo de patente. Logo, detalhes sobre propriedades químicas e físicas da substância não puderam ser compartilhados. Os grupos funcionais presentes na molécula do repelente já são encontrados atualmente em outras moléculas usadas para essa finalidade. Além disso, a molécula original apresenta baixa toxicidade para os seres humanos e a ecotoxicidade da nova molécula será analisada nos testes do presente estudo.

#### 3.2 PREDIÇÕES *IN SILICO*

Foram utilizadas três ferramentas computacionais gratuitamente disponíveis para estimar dados de avaliação de perigo da nova substância repelente a partir da sua estrutura molecular. Através do uso do software QSAR Toolbox foi possível traçar um perfil ecotoxicológico da nova substância repelente, além de predições de LC<sub>50</sub> 96h de toxicidade aguda para peixes e EC<sub>50</sub> em algas.

Após a obtenção da fórmula SMILES do repelente, foram utilizados 3 modelos de bioconcentração em peixes na plataforma VEGA para cálculo do LogP da nova substância repelente, além de um modelo de toxicidade aguda para peixes (LC<sub>50</sub>). A predição é feita com base na similaridade de compostos existentes na base de dados, que leva em consideração as propriedades moleculares e físico-químicas dos compostos que compõem o modelo. A ferramenta *in silico* Toxtree também foi utilizada através de uma abordagem de árvores de decisão, para previsão de perigo tóxico e biodegradabilidade.

### 3.3 TESTE DA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Desmodesmus subspicatus*

As cepas de *D. subspicatus* (Figura 2) foram obtidas a partir de culturas mantidas no Laboratório de Fisiologia de Plantas sob Estresse (Departamento de Botânica) e inoculadas em frascos Erlenmeyer (250mL) com meio de cultivo CHU (pH 7,30 ± 0,50) para garantir o alcance do crescimento em fase exponencial. As microalgas foram mantidas em câmaras BOD de 25 ± 2 °C sob um fotoperíodo de 10/14 horas com intensidade de 45 m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> até atingirem uma densidade de 1x10<sup>6</sup> células/mL.

FIGURA 2– MORFOLOGIA DA MICROALGA *D. subspicatus* OBSERVADA EM MICROSCOPIA ÓPTICA



FONTE: Universität Göttingen (2015).

O plaqueamento das microalgas foi realizado em placas estéreis de 12 poços em 5 mL de meio CHU (pH 7,30 ± 0,50), sendo os poços apenas com meio de cultivo

utilizadas como controle negativo (CN), controle solvente (CS) sendo meio contendo DMSO a 0,5% (v/v). As células foram expostas à 6 concentrações da molécula repelente (31,25, 62,5, 125, 250, 500, 1000 mg/L) em 0,5% de DMSO (triplicata técnica) por 72 horas.

A contagem das células em câmaras de Neubauer, em microscópio óptico, foi realizada nos tempos: inicial (0 h), 24 h, 48 h e 72 h após a exposição. Para calcular a concentração celular, empregou-se a equação (1) para as contagens de células efetuadas nos quadrantes grandes ou (2) para as contagens nos quadrantes médios.

$$y = XA.FD.10^4 \quad (1)$$

$$y = XC.FD.1,6.10^5 \quad (2)$$

Sendo: y= concentração celular (células/mL); XA= média das contagens entre os quatro campos indicados pela letra A; XC= média das contagens entre os cinco campos indicados pela letra C; FD= fator utilizado para diluições realizadas (quando não realizada diluição, o valor é 1).

A taxa de inibição de crescimento (TI) foi calculada conforme a equação (3) e utilizada para os cálculos da EC<sub>50</sub> após a exposição de 72h.

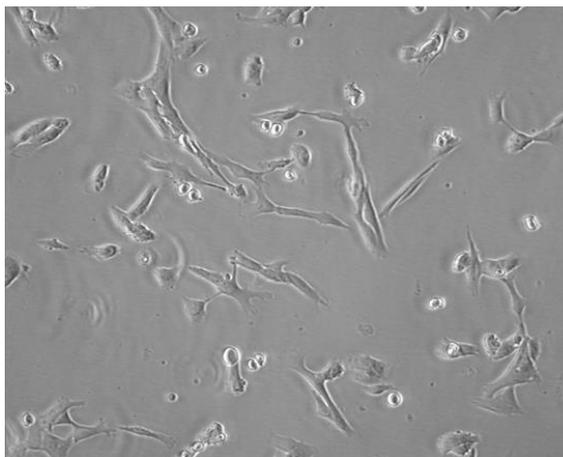
$$TI = \frac{(Cc-Ct)}{Cc} \times 100 \quad (3)$$

Sendo: Cc= Concentração celular do grupo controle solvente; Ct= Concentração celular dos grupos expostos a nova substância repelente.

### 3.4 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA PARA PEIXES COM CÉLULAS RTgill-W1

Para a realização do ensaio OECD TG 249, foi necessário o cultivo da linhagem de células RTgill-W1 (ATCC CRL-2523), doada para o Laboratório de (Eco)Toxicologia *In Vitro* pela Universidade de Washington. As células foram cultivadas em meio L-15 (4,7% SBF) e incubadas a 20°C. A morfologia e o crescimento das células, além da ausência de contaminação, foram verificados com uma certa periodicidade por meio de microscopia de luz (Figura 3).

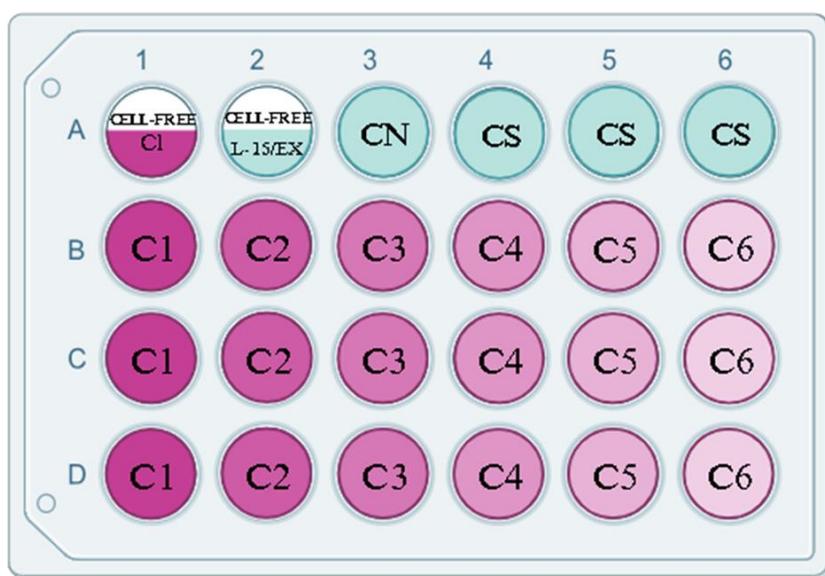
FIGURA 3 – LINHAGEM RTGILL-W1 VISUALIZADA EM MICROSCÓPIO INVERTIDO



FONTE: ATCC CRL-2523 (2023).

Após o crescimento das células na garrafa T175, o plaqueamento prosseguiu quando se obteve quantidade suficiente para duas placas de 24-poços (200.000 células/poço), uma placa teste e outra placa controle positivo (3,4-dicloroanilina). Confirmada a formação de monocamada confluenta dentro de cada poço (apenas monocamadas devem ser usadas para o ensaio) por microscopia, seguiu-se para a etapa de exposição (Figura 4). As células foram expostas à substância repelente em 6 concentrações (31,25, 62,5, 125, 250, 500, 1000 mg/L) em DMSO 0,5%. Na placa de controle positivo as concentrações de 3,4-DCA foram de 3,12, 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 mg/L. A placa foi coberta com folha adesiva e incubada por 24 horas a 20°C no escuro.

FIGURA 4 – ESQUEMA DE PIPETAGEM DO REPELENTE EM ESTUDO



Legenda: Seis concentrações de teste em triplicata técnica com “conc. 1” significando a concentração de teste mais alta.

FONTE: Adaptado OECD Test Guideline 249.

Após a lavagem de cada poço com PBS, foi adicionada a solução com 5% (v/v) de *AlamarBlue*<sup>TM</sup> e 4 µM de CFDA-AM e a placa foi incubada por 30 minutos a 20°C no escuro. A fluorescência de *AlamarBlue*<sup>TM</sup> foi medida (exc: 530 nm, em: 595 nm) assim como de CFDA-AM (exc: 493 nm, em: 541 nm) com leitor de placas fluorescentes. A solução de *AlamarBlue*<sup>TM</sup> e CFDA-AM foi descartada e a solução de Vermelho Neutro foi adicionada em cada poço. Após 60 min de incubação a 20 °C no escuro, a solução de Vermelho Neutro foi descartada e cada poço lavado com fixador, e posteriormente, a solução de extração foi adicionada. A placa foi incubada por 10 min enquanto agitada suavemente em um agitador de placas à temperatura ambiente e, posteriormente, a fluorescência do Vermelho Neutro (exc: 530 nm, em: 645 nm) foi medida pelo leitor de placas fluorescentes.

Os dados de fluorescência obtidos são usados para calcular a porcentagem da viabilidade celular comparado ao controle de solvente. A fluorescência média correspondente ao controle sem células foi subtraída dos valores de fluorescência de cada poço da placa teste correspondente. Assim, foi calculado a porcentagem de viabilidade celular de cada concentração em relação ao respectivo controle. Portanto, a média das unidades de fluorescência do controle solvente é ajustada para 100% (indicando que 100% das células são viáveis) e a viabilidade celular correspondente é calculada. Os valores de EC<sub>50</sub> são calculados com base no ajuste da curva de concentração-resposta de regressão não linear sigmoide.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 PREDIÇÕES *IN SILICO*

O perfil de risco ecológico da nova substância repelente fornecido pelo software OECD QSAR Toolbox indicou que a nova substância repelente não tem potencial bioacumulativo, alta biodegradabilidade e se enquadrou na classe 3 na classificação de toxicidade aquática por Verhaar (Tabela 2). Através do fluxo de trabalho automatizado, foi prevista a LC<sub>50</sub> 96 h de 71,1 mg/L, utilizando a espécie

*Pimephales promelas*. O método de estimativa dos dados foi análise de tendências (regressão linear) e a substância foi considerada dentro do domínio de aplicabilidade (DA) do método utilizado. A EC<sub>50</sub> em algas (*Desmodesmus subspicatus*) foi estimada em 32 mg/L através de regressão linear, porém, sem usar um fluxo automatizado (não disponível).

Os três modelos de bioconcentração em peixes obtidos através da plataforma VEGA apresentaram Log P < 3 e domínio de aplicabilidade aceitável, confirmando o baixo potencial de bioconcentração da substância repelente. O modelo de toxicidade aguda em peixes (LC<sub>50</sub>) do EPA apresentou resultado de 76.81 mg/L, com DA aceitável e valor coincidente com o obtido através do QSAR Toolbox.

As predições do programa Toxtree classificaram o repelente como classe 3 (moderadamente tóxico) na classificação de perigo tóxico pela EPA e classe 1 em biodegradabilidade, ou seja, rapidamente biodegradável.

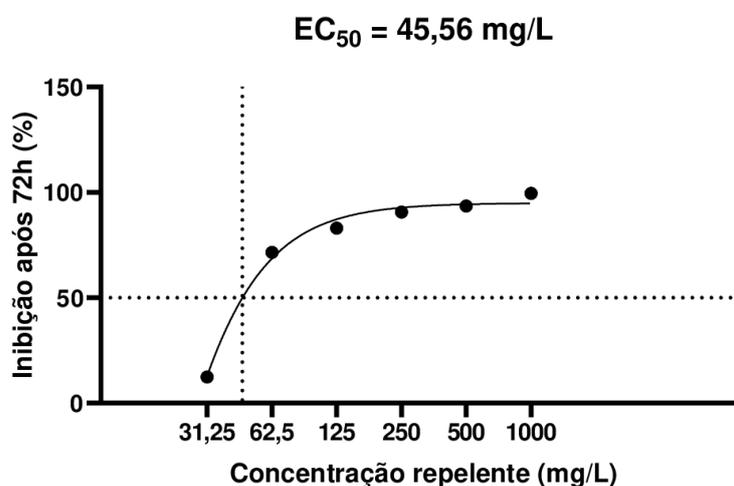
TABELA 2 – PREDIÇÕES *IN SILICO* DA NOVA SUBSTÂNCIA REPELENTE

Plataforma	Análise	Resultado
<b>QSAR Toolbox</b>	Classificação de toxicidade aquática por Velaar (Modificado)	Classe 3 (reatividade não específica)
	Bioacumulação	Muito rápido
	Biodegradabilidade	Rápida
	Toxicidade aguda para peixes ( <i>Pimephales promelas</i> )	LC <sub>50</sub> 96h = 71,1 mg/L
	Teste de inibição do crescimento de algas ( <i>Desmodesmus subspicatus</i> )	EC <sub>50</sub> = 32 mg/L
<b>VEGA</b>	Bioacumulação	BCF (CAESAR) 2.1.15 = LogP 1.24 (índice DA = 0.85) BCF (Meylan) 1.0.4 = LogP 2.33 (índice DA = 0.75) BCF (Arnot-Gobas) = LogP 2.33 (índice DA = 0.85)
	Toxicidade aguda para peixes (Fathead Minnow)	Fish Acute = LC <sub>50</sub> (EPA) 76.81 mg/L (índice DA = 0.85)
<b>Toxtree</b>	Classificação de perigo tóxico	Classe 3
	Biodegradabilidade	Classe 1 (rapidamente biodegradável)

#### 4.2 TESTE DA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Desmodesmus subspicatus*

No teste de inibição do crescimento de *Desmodesmus subspicatus* (OECD TG 201) foi observada uma diminuição da taxa de crescimento das células expostas à nova substância repelente quando comparada ao grupo solvente (DMSO 0,5%). A  $EC_{50}$  obtida com as taxas de inibição no tempo de 72 horas foi de aproximadamente 45,6 mg/L da molécula com ação repelente.

FIGURA 5 – TAXA DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE *D. subspicatus* EM CADA CONCENTRAÇÃO DO REPELENTE.



Legenda. O gráfico mostra as porcentagens de inibição de crescimento celular de *Desmodesmus subspicatus* em 6 concentrações diferentes (31,25 – 1000) do repelente (mg/L).

#### 4.3 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA PARA PEIXES COM CÉLULAS RTgill-W1

Seguindo os critérios de validação do teste de toxicidade aguda com células RTgill-W1 especificados na diretriz da OECD TG 249, o ensaio realizado se enquadrou no critério de validade. A variação dos dados brutos de fluorescência dos dois poços de controle sem células (A1 contendo L-15/ex e A2 contendo L-15/ex com a maior concentração do produto químico em teste) não excedeu 20%, excluindo interferência do repelente por autofluorescência. O controle solvente não foi inferior em mais de 10% ao controle negativo em termos de viabilidade celular (Tabela 3), mostrando a não contaminação em relação ao solvente utilizado, DMSO. Além disso, os valores médios de  $EC_{50}$  para o controle positivo de 3,4-DCA, que são baseados em

concentrações nominais, estavam entre 2½ desvios padrão (SD) dos valores de EC<sub>50</sub> (Tabela 4). O valor médio de cada um dos corantes está dentro da faixa de referência, sugerindo que o teste executado está de acordo com os critérios de aceitabilidade da OECD.

TABELA 3– CRITÉRIOS DE CONFIABILIDADE NAS PLACAS DE CONTROLE POSITIVO E TESTE

	Variação dos dados de fluorescência entre os poços A1 e A2 (%)			
	AlamarBlue™	CFDA-AM	Vermelho Neutro	VR
Placa CP	1,85%	2,94%	18,64%	>20%
Placa Repelente	1,30%	0%	9,90%	>20%
	Diferença de viabilidade celular entre controle negativo e controle solvente (%)			
	AlamarBlue™	CFDA-AM	Vermelho Neutro	VR
Placa CP	7,19%	4,76%	8,41%	>10%
Placa Repelente	3,34%	3,09%	8,98%	>10%

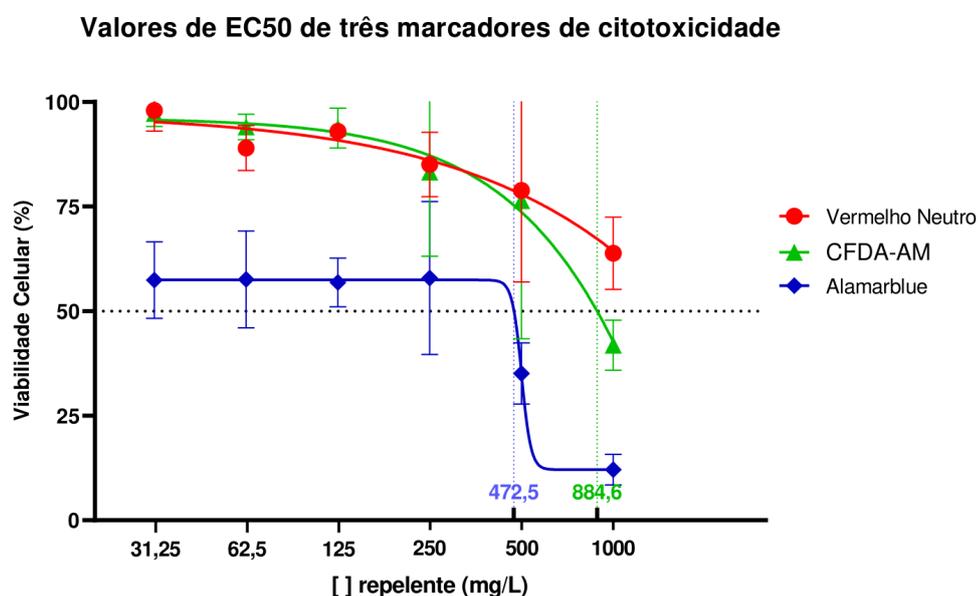
Fonte: A autora (2023).

TABELA 4 – VALORES DE EC<sub>50</sub> DO CONTROLE POSITIVO (3,4-DCA)

	Valor médio aceito pela OECD (Desvio Padrão)	Faixa de referência aceito pela OECD	Valores obtidos
EC <sub>50</sub> 3,4-DCA Resazurin	43.6 mg/L ± 6.1 mg/L	28.4 mg/L a 58.9 mg/L	28,6 mg/L
EC <sub>50</sub> 3,4-DCA CFDA-AM	62.5 mg/L ± 18.9 mg/L	15.3 mg/L a 109.8 mg/L	39 mg/L
EC <sub>50</sub> 3,4-DCA Vermelho Neutro	58.6 mg/L ± 18.6 mg/L	12.1 mg/L a 105.0 mg/L	34.32 mg/L

Fonte: A autora (2023).

FIGURA 6 – VALORES DE EC<sub>50</sub> DE TRÊS MARCADORES DE CITOTOXICIDADE



Fonte: A autora (2023).

Legenda: O gráfico mostra as porcentagens de viabilidade celular em 6 concentrações diferentes (31,25 – 1000 mg/L) do repelente (mg/L). Os valores de EC<sub>50</sub> para cada marcador fluorescente (Vermelho Neutro, *AlamarBlue*<sup>TM</sup>, CFDA-AM) são mostrados no eixo y com a respectiva cor da legenda. Fonte: A autora (2023).

Com as 6 concentrações da nova substância repelente escolhidas (31,25 – 62,5 – 125 – 250 – 500 – 1000 mg/L), a partir da análise da curva dose-resposta, foi possível coletar dados preliminares de EC<sub>50</sub> para cada marcador fluorescente. Vermelho Neutro: > 1000 mg/L (máxima concentração testada); CFDA-AM: 884,6 mg/L; *AlamarBlue*<sup>TM</sup>: 472,5 mg/L (Figura 6). Para adotar uma abordagem mais conservadora na avaliação de toxicidade aguda para peixes da substância-teste, o protocolo da OECD TG 249 determina que se deve considerar o menor valor de EC<sub>50</sub>, ou seja, 472,5 mg/L (*AlamarBlue*<sup>TM</sup>).

#### 4.4 COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS

Segundo o GHS, com os dados dos três marcadores do ensaio OECD TG 249, a nova substância repelente se enquadra na categoria 4 de toxicidade aquática aguda para peixes, ou seja, pouco tóxica (Quadro 3). Comparando os valores de viabilidade dos três marcadores da nova substância repelente, é possível entender que a molécula foi mais sensível para o marcador *AlamarBlue*<sup>TM</sup>, pois apresentou o menor valor de EC<sub>50</sub> quando comparado aos outros marcadores. Já no ensaio OECD TG 201, o repelente apresentou toxicidade maior para microalgas, entrando na categoria 3 (moderadamente). Tendo isso em vista, é necessário realizar testes adicionais para aprofundar a investigação sobre o modo de ação dessas substâncias e compreender as variações conforme os diferentes organismos.

QUADRO 3 – CLASSIFICAÇÃO DE TOXICIDADE AQUÁTICA SEGUNDO A AGÊNCIA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL DOS EUA

<b>Categoria de Toxicidade</b>	<b>Valor EC<sub>50</sub> e LC<sub>50</sub> para toxicidade aquática para peixes, algas e microcrustáceos (mg/L)</b>
Muito tóxico	< 0,1
Tóxico	> 0,1 – 1
Moderadamente tóxico	> 1 – 10
Levemente tóxico	> 10 – 100
Praticamente não tóxico	>100

FONTE: Adaptado de EPA (2023)

Os resultados gerados indicam que os dados obtidos experimentalmente foram compatíveis com as previsões de toxicidade aguda para peixes e algas pelo QSAR Toolbox, VEGA e Toxtree em relação à sensibilidade dos organismos-teste. Assim como estudo de Gao e colaboradores (2020) de avaliação de toxicidade aquática do DEET, foi observada maior sensibilidade das microalgas quando expostas à nova substância repelente. Os dados de três ferramentas *in silico* diferentes também foram compatíveis quanto ao baixo potencial de bioacumulação e alta biodegradabilidade da nova substância repelente.

## 5 CONCLUSÕES

O levantamento das predições *in silico* mostrou que a nova substância repelente não possui bioacumulação significativa e sua biodegradabilidade é alta. Em concordância com os modelos computacionais, o ensaio de citotoxicidade com RTgill-W1 demonstrou menor potencial de toxicidade aguda para peixes da nova substância repelente quando comparada aos repelentes mais comercializados (DEET e Icaridina). No entanto, para algas permanece na mesma categoria que os mais populares, classificação de toxicidade moderada. A diferença na sensibilidade dos organismos-teste sugere mais pesquisas acerca do modo de ação da substância, em membrana celulares vegetais e animais, por exemplo.

A análise integrada dos dados por meio NAMs indicou que a nova substância repelente apresenta baixo potencial de perigo para o ambiente aquático. O presente estudo se limita ao não abordar avaliações de risco para compreender os possíveis efeitos prejudiciais à exposição real a concentrações ambientalmente significativas. Fica claro a importância da realização de mais testes quanto à toxicidade que representem diversos níveis tróficos e ecossistema para uma avaliação mais precisa e ampla quanto a segurança ambiental de novas substâncias.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R. M. *et al.* High mortality in aquatic predators of mosquito larvae caused by exposure to insect repellent. **Biology Letters**, v. 14, n. 10, 1 out. 2018.

ARONSON, D. *et al.* Environmental release, environmental concentrations, and ecological risk of N,N-diethyl-m-toluamide (DEET). **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 8, n. 1, 2012.

BLÁZQUEZ, M. *et al.* Comparing in vivo data and in silico predictions for acute effects assessment of biocidal active substances and metabolites for aquatic organisms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 205, 2020.

BOLS, N. C. *et al.* Chapter 2: Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. Piscine cell lines in environmental toxicology. **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**, v. 6, n. C, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. Plano de Contingência para Resposta às Emergências em Saúde Pública por Dengue, Chikungunya e Zika. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-onteudo/publicacoes/svsa/dengue/plano-de-contingencia-para-resposta-as-emergencias-em-saude-publica-por-dengue-chikungunya-e-zika>

BRAUSCH, J. M.; RAND, G. M. A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity. **Chemosphere**, v. 82, n. 11, p. 1518–1532, 1 mar. 2011.

BURDEN, N. *et al.* Adverse Outcome Pathways can drive non-animal approaches for safety assessment. **Journal of Applied Toxicology**, v.35, n.9, p. 971- 975, 2015.

BURDEN, N. *et al.* Key Opportunities to Replace, Reduce, and Refine Regulatory Fish Acute Toxicity Tests. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 39, n. 10, 2020.

BURDEN, N.; SEWELL, F.; CHAPMAN, K. Testing Chemical Safety: What Is Needed to Ensure the Widespread Application of Non-animal Approaches? **PLoS Biology**, v. 13, n. 5, 2015.

CAMPOS, D. et al. Toxicity assessment of binary mixtures of BP3 with 4-MBC (UV-filters), and BP3 with DEET (insect repellent) using the aquatic midge *Chironomus riparius*. **Science of The Total Environment**, v. 892, p. 164594, 20 set. 2023.

CASSANI, S.; GRAMATICA, P. Identification of potential PBT behavior of personal care products by structural approaches. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 1, 2015.

CATTANEO, I. et al. Implementing New Approach Methodologies (NAMs) in food safety assessments: Strategic objectives and actions taken by the European Food Safety Authority. **Trends in Food Science & Technology**, v. 133, p. 277–290, 1 mar. 2023.

CESCHIN, S.; BELLINI, A.; SCALICI, M. Aquatic plants and ecotoxicological assessment in freshwater ecosystems: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 5, p. 4975–4988, 1 fev. 2021.

COSTA, M. B. et al. Accumulation and effects of copper on aquatic macrophytes *Potamogeton pectinatus* L.: Potential application to environmental monitoring and phytoremediation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 155, p. 117–124, 15 jul. 2018.

COSTANZO, S. D. et al. Is there a risk associated with the insect repellent DEET (N,N-diethyl-m-toluamide) commonly found in aquatic environments? **Science of the Total Environment**, v. 384, n. 1–3, 2007.

DA SILVA, M. R. M.; RICCI-JÚNIOR, E. An approach to natural insect repellent formulations: from basic research to technological development. **Acta Tropica**, v. 212, 1 dez. 2020.

DE ALBUQUERQUE VITA, N. *et al.* The development and application of a novel hazard scoring tool for assessing impacts of cosmetic ingredients on aquatic ecosystems: A case study of rinse-off cosmetics. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 19, n. 6, p.1619-1635, 2023.

DE ARAÚJO, G. L. *et al.* Alternative methods in toxicity testing: the current approach. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 1, p. 55–62, 2014.

DEBBOUN, M.; FRANCES, S. P.; STRICKMAN, D. A. **Insect repellents handbook**. Boca Raton, 2014.

DEGENNARO, M. The mysterious multi-modal repellency of DEET. **Fly**, v. 9, n. 1, p. 45 – 51, 2015.

DENG, W. *et al.* Repellent Screening of Selected Plant Essential Oils Against Dengue Fever Mosquitoes Using Behavior Bioassays. **Neotropical Entomology**, v. 52, n. 3, 2023.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, U. S. **Technical Overview of Ecological Risk Assessment - Analysis Phase: Ecological Effects Characterization**, 2023. Disponível em: <<https://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/technical-overview-ecological-risk-assessment-0>>.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, U. S. **White Paper Aquatic Life Criteria for Contaminants of Emerging Concern Part I General Challenges and Recommendations**, 2008.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms**, Washington, 2002.

EUROPEAN CHEMICALS AGENCY (ECHA). **Regulation (EU) n°528/2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products**,

2014. Disponível em: <<https://echa.europa.eu/documents/10162/aaf5b78c-82ca-40a3-25a4-1cc4339c9407>>.

FISCHER, M. et al. Repeatability and reproducibility of the RTgill-W1 cell line assay for predicting fish acute toxicity. **Toxicological Sciences**, v. 169, n. 2, p. 353–364, 1 jun. 2019.

GAO, X. et al. Aquatic life criteria derivation and ecological risk assessment of DEET in China. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 188, 30 jan. 2020.  
Geneva: WHO; 2017.

GOODYER, L. I. et al. Expert review of the evidence base for arthropod bite avoidance. **Journal of Travel Medicine**, v. 17, n. 3, p. 182–192, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20536888/>>

HIGUCHI, Célio; DE CÁSSIA, Leticia; DIAS, Valim; et al. REGULAMENTAÇÃO DE COSMÉTICOS ORGÂNICOS NO BRASIL: APELO SUSTENTÁVEL A PELE, **Revista de Saúde, Meio Ambiente e Sustentabilidade**, v. 7, n. 1, 2012.

JOINT RESEARCH CENTRE, INSTITUTE FOR HEALTH AND CONSUMER PROTECTION. **EURL ECVAM strategy to replace, reduce and refine the use of fish in aquatic toxicity and bioaccumulation testing**, Publications Office, 2014.

JYOTI, D.; SINHA, R. Physiological impact of personal care product constituents on non-target aquatic organisms. **Science of The Total Environment**, v. 905, p. 167229, 20 dez. 2023.

KATZ, T. M et al. Insect repellents: Historical perspectives and new developments. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.58, n.5, p 865 – 871, 2008.

KREBS, J.; MCKEAGUE, M. Green Toxicology: Connecting Green Chemistry and Modern Toxicology. **Chemical Research in Toxicology**, v.33, n.12, p 2919 - 2931, 2008.

LECHUGA, M. et al. Acute toxicity of anionic and non-ionic surfactants to aquatic organisms. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 125, p. 1–8, 2016.

LOOS, R. et al. Analysis of polar organic contaminants in surface water of the northern Adriatic Sea by solid-phase extraction followed by ultrahigh-pressure liquid chromatography-QTRAP® MS using a hybrid triple-quadrupole linear ion trap instrument. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 18, p. 5875–5885, 2013.

LUCAS-BARBOSA, D. et al. Skin bacterial volatiles: propelling the future of vector control. **Trends in Parasitology**, v. 38, n. 1, p. 15–22, 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34548253/>>.

LUO, L. et al. Differential effects of bisphenol A toxicity on oyster (*Crassostrea angulata*) gonads as revealed by label-free quantitative proteomics. **Chemosphere**, v. 176, 2017.

MA, L. et al. Impacts of irrigation water sources and geochemical conditions on vertical distribution of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in the vadose zone soils. **Science of The Total Environment**, v. 626, p. 1148–1156, 1 jun. 2018.

MACEDO, S.; TORRES, T.; SANTOS, M. M. Methyl-triclosan and triclosan impact embryonic development of *Danio rerio* and *Paracentrotus lividus*. **Ecotoxicology**, v. 26, n. 4, 2017.

MAERTENS, A.; HARTUNG, T. Green Toxicology-know early about and avoid toxic product liabilities. **Toxicological Sciences**, v. 161, n. 2, p. 285–289, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29267930/>>.

MAIA, M. F.; MOORE, S. J. Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing. **Malaria Journal**, v. 10, n. S1, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21411012/>>.

MAZZATORTA, P. et al. QSAR in Ecotoxicity: An Overview of Modern Classification Techniques. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 44, n. 1, p. 105–112, 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14741016/>>.

MORIN-CRINI, N. et al. Emerging Contaminants: Analysis, Aquatic Compartments and Water Pollution. **Environmental chemistry for a sustainable world**, p. 1–111, 2021.

NAGY, K. et al. Systematic review of comparative studies assessing the toxicity of pesticide active ingredients and their product formulations. **Environmental Research**, v. 181, 2020.

NATSCH, A. et al. Accurate prediction of acute fish toxicity of fragrance chemicals with the RTgill-W1 cell assay. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 37, n. 3, p. 931–941, 2018.

NERIO, L. S.; OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E. Repellent activity of essential oils: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. 372–378, 1 jan. 2010.

NOHYNEK, G. J. et al. Safety assessment of personal care products/cosmetics and their ingredients. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 243, n. 2, 2010.

NORRGREN, L. Fish models for ecotoxicology. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 54, n. 1, 2012.

OLIVEIRA, G. A. R. DE et al. A test battery for assessing the ecotoxic effects of textile dyes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 291, 2018.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 2. **Test Guideline No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test**, 2011.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 2. **Test Guideline No. 249 - Fish Cell Line Acute Toxicity: The RTgill-W1 cell line assay**, 2021. Paris: OECD

Publishing. Disponível em: <[https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-249-fish-cell-line-acute-toxicity-the-rtgill-w1-cell-line-assay\\_c66d5190-en](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-249-fish-cell-line-acute-toxicity-the-rtgill-w1-cell-line-assay_c66d5190-en)>.

PAIXÃO, S. M. et al. Performance of a miniaturized algal bioassay in phytotoxicity screening. **Ecotoxicology**, v. 17, n. 3, p. 165–171, 4 abr. 2008.

PARDINI, F. et al. Development and characterization of electrosprayed microcapsules of poly  $\epsilon$ -caprolactone with citronella oil for mosquito-repellent application. **International Journal of Polymer Analysis and Characterization**, v. 26, n. 6, 2021.

PAUMGARTTEN, F. J. R.; DELGADO, I. F. Repelentes de mosquitos, eficácia para prevenção de doenças e segurança do uso na gravidez. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 4, n. 2, 2016.

PEDROUZO, M. et al. **Analytical methods for personal-care products in environmental waters. TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, 2011.

PINO-OTÍN, M. R. et al. Impact of citronellol on river and soil environments using non-target model organisms and natural populations. **Journal of Environmental Management**, v. 287, 2021.

POHLIT, A. M. et al. Patent Literature on Mosquito Repellent Inventions which Contain Plant Essential Oils - A Review. **Planta Medica**, v. 77, n. 06, p. 598–617, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21328177/>>.

QUEDNOW, K.; PÜTTMANN, W. Temporal concentration changes of DEET, TCEP, terbutryn, and nonylphenols in freshwater streams of Hesse, Germany: Possible influence of mandatory regulations and voluntary environmental agreements. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 16, n. 6, 2009.

RAUNIO, H. In silico toxicology non-testing methods. **Frontiers in Pharmacology**, v.2, 2011.

ROY, D. N et al. The insect repellents: A silent environmental chemical toxicant to the health. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 50, p. 91–102, 2017.

Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28171823/>>

RUSSEL, W.; BURCH, R. The Principles of Humane Experimental Technique

Russell WMS & Burch RL (1959) The principles of humane experimental technique.

**Medical Journal of Australia**, v. 1, n. 13, 1959.

SAKULKU, U. et al. Characterization and mosquito repellent activity of citronella oil nanoemulsion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 372, n. 1–2, 2009.

SARIGIANNIS, D. A. et al. In silico methods and in silico toxicology. **Reference Module in Biomedical Sciences**, 2023.

SCHOLZ, S. et al. A European perspective on alternatives to animal testing for environmental hazard identification and risk assessment. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 67, n. 3, p. 506–530, 1 dez. 2013.

SCHULTZ, T. W. et al. The OECD QSAR Toolbox Starts Its Second Decade.

**Methods in molecular biology**, p. 55–77, 2018. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29934887/>>

SHARMA, R. et al. Therapeutic Potential of Citronella Essential Oil: A Review.

**Current Drug Discovery Technologies**, v. 16, n. 4, 2018.

STAHLMANN, R.; HORVATH, A. Risks, risk assessment and risk competence in toxicology. **GMS GermanMedicalScience**, v. 13, 2015.

STEFANI, G. P. et al. Repelentes de insetos: recomendações para uso em crianças.

**Revista Paulista de Pediatria**, v. 27, n. 1, 2009.

SUI, Q. et al. Occurrence and removal of pharmaceuticals, caffeine and DEET in wastewater treatment plants of Beijing, China. **Water Research**, v. 44, p. 417–426, 2009.

SULLIVAN, K. et al. A discussion of the impact of us chemical regulation legislation on the field of toxicity testing. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 6, 2011.

SUN, H. Q. et al. Acute toxicity and ecological risk assessment of benzophenone and N,N-diethyl-3 methylbenzamide in personal care products. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 9, 19 set. 2016.

TANNEBERGER, K. et al. Predicting fish acute toxicity using a fish gill cell line-based toxicity assay. **Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 2, p. 1110–1119, 15 jan. 2013.

TAVARES, M. et al. Trends in insect repellent formulations: A review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 539, n. 1-2, p. 190–209, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29410208/>>.

TISGRATOG, R. et al. Plants traditionally used as mosquito repellents and the implication for their use in vector control. **Acta Tropica**, v. 157, p. 136–144, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26826392/>>.

TRONGTOKIT, Y. et al. Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 4, 2005.

VENDRELL, E. et al. Effect of glyphosate on growth of four freshwater species of phytoplankton: A microplate bioassay. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 82, n. 5, 2009.

VERHAAR, H. J. M.; VAN LEEUWEN, C. J.; HERMENS, J. L. M. Classifying environmental pollutants. **Chemosphere**, v. 25, n. 4, 1992.

WANG, H. et al. Ecotoxicological effects, environmental fate and risks of pharmaceutical and personal care products in the water environment: A review. **Science of The Total Environment**, v. 788, p. 147819, 2021.

WEEKS, J. A.; GUINEY, P. D.; NIKIFOROVZ, A. I. Assessment of the environmental fate and ecotoxicity of N,N-diethyl-m-toluamide (DEET). **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 8, n. 1, 2012.

WESTMORELAND, C. et al. Use of New Approach Methodologies (NAMs) in regulatory decisions for chemical safety: Report from an EPA A Deep Dive Workshop. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 135, p. 105261, 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Ethics And Vector-Borne Diseases: WHO guidance**, 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global vector control response 2017-2030**.

ZARA, A. L. DE S. A. et al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. Epidemiologia e serviços de saúde. **Revista do Sistema Único de Saúde do Brasil**, 2016.

ZELIKOFF, J. T. Biomarkers of immunotoxicity in fish and other non-mammalian sentinel species: predictive value for mammals? **Toxicology**, v. 129, n. 1, p. 63–71, 1998.